

Evaluation eines von-Willebrand-Faktor-Propeptid Assays für eine verbesserte Diagnosestellung und Überwachung von Patienten und Patientinnen mit von-Willebrand-Syndrom

Velina, Dincic, 17-20 B

Bildungsgang Biomedizinische Analytik HF

Inselspital Bern, Zentrum für Labormedizin (ZLM) - Hämostase

1. Zusammenfassung

Das von-Willebrand-Syndrom (VWS) ist die häufigste hereditäre Blutungsneigungserkrankung. Es wird je nach Ausprägung in Typ 1, Typ 2 (2A, 2B, 2M und 2N) oder Typ 3 unterteilt. Gewisse Autoren unterscheiden innerhalb des VWS Typ 1, aufgrund einer erhöhten Clearance des Von-Willebrand-Faktors (VWF), einen Typ 1C. Zudem gibt es auch das erworbene VWS, bei diesem kann die Clearance des VWF auch erhöht sein. Das Ziel dieser Arbeit ist es einen VWF:Propeptid (VWF: PP)-ELISA auszutesten, um ihn für eine verbesserte Diagnostik von Personen mit VWS einsetzen zu können. Mittels Inter- und Intra-Assay wird die Präzision des Tests beurteilt. Die Kohorte besteht aus Personen mit VWS und aus gesunden Probanden. Die erzielten Resultate, weisen auf eine geringe Präzision hin. Weiterführend könnte das Coating der ELISA-Küvetten selbst durchgeführt werden, um eine Regelmässigkeit zu schaffen.

Schlüsselbegriffe: VWF: PP, von-Willebrand-Syndrom, VWF-Clearance, ELISA

2. Einleitung

Für die VWS-Diagnostik werden im ZLM Inselspital derzeit die in-vitro-Blutungszeit mit PFA-200, die von-Willebrand-Faktor-Aktivität (VWF: Ac.), das VWF-Antigen (VWF: Ag) und die VWF-Multimeranalyse, bei welcher eine erhöhte VWF-Clearance vermutet werden kann, herangezogen. Bei dem Verdacht einer erhöhten VWF-Clearance wird zusätzlich ein aufwändiger DDAVP-Test durchgeführt.

Der VWF ist ein Glykoprotein, welches für die Aufrechterhaltung und Regulierung der normalen Hämostase wichtig ist. Die Synthese findet dabei in Endothelzellen und in Megakaryozyten statt, bei der Sekretion des VWF kommt es zur Trennung des VWF: Ag und des VWF: PP. Durch unterschiedliche Metabolisierung kann eine VWF: PP/VWF: Ag-Ratio berechnet werden [1], welche bei einer gesteigerten Clearance von VWF erhöht wäre. Die Messung des VWF: PP würde eine schnelleren Diagnosestellung, sowie die Therapiewahl begünstigen [2].

Die Domänen A1 und A3 des VWF sind für die Thrombozytenbindung/-aktivierung und für die subendotheliale Kollagenbindung zuständig [3]. Die Spaltstelle für ADAMTS13 (A Disintegrin and Metalloproteinase with Thrombospondin type-1 repeats) befindet sich bei der Domäne A2. Weiter schützt der VWF den Faktor VIII (FVIII) vor vorzeitiger Proteolyse. Eine quantitative und/oder qualitative Verminderung des VWF kann zur häufigsten Blutungsneigungserkrankung, dem VWS führen [4], welches in verschiedene Typen eingeteilt wird, siehe Tabelle 2.1 basierend auf [1] und [5]. Daneben gibt es noch das erworbene VWS, wo je nach Ätiologie eine erhöhte Clearance möglich ist [5].

Tabelle 2.1 Einteilung der VWS-Typen und Subtypen

VWS Typ	Subtyp	Beschreibung
1		Quantitativer Defekt ohne Funktionsstörung
	C	Erhöhte Clearance vom VWF
		Qualitativer Defekt
2	A	Das Fehlen grosser Multimere führt zu einer gestörten Interaktion des VWF mit Thrombozyten.
	B	Die Interaktion des VWF mit dem Rezeptor GPIb ist gesteigert.
	M	Die Interaktion des VWF mit Thrombozyten ist gestört, ohne dass grosse Multimere fehlen.
	N	Die FVIII-Bindungs Kapazität ist vermindert.
3		VWF fehlt vollständig, sowohl im Plasma als auch im Gewebe.

3. Ziel und Fragestellung

Das Ziel dieser Arbeit ist das Austesten und Validieren des VWF-Propeptid-Assays von Haemochrom Diagnostica, damit dieser künftig im Hämostaselabor des ZLM Inselspital durchgeführt werden kann, um die von-Willebrand-Diagnostik zu unterstützen.

Hierbei wird auf die Fragestellung 1 der Diplomarbeit eingegangen:

Sind die Resultate des VWF: PP-Assays brauchbar, sodass sie die Interpretation von von-Willebrand-Syndrom Erkrankten unterstützen können?

Referenzen:

- [1] Haberichter, S. L. (2015). Von Willebrand factor propeptide: biology and clinical utility. *BLOOD The American Society of Hematology*, 126(15), 1753-1761. doi: 10.1182/blood-2015-04-512731.
- [2] Budde, U., & Schnepfenheim, R. (2010). Von-Willebrand-Faktor- und ADAMTS13-Diagnostik. In B. Pötzsch, & K. Madlener (Hrsg.) *Hämostaseologie: Grundlagen, Diagnostik, Therapie* (877-889). Berlin Heidelberg: Springer-Verlag.
- [3] Leebeek, F. W. G., & Eikenboom, J. C. J. (2016). Von Willebrand's Disease. *The New England Journal of Medicine* 375(21), 2067-2080. doi: 10.1056/NEJMr1601561.
- [4] O'Sullivan, J. M., Ward, S., Lavin, M., & O'Donnell, J.S. (2018). Von Willebrand factor clear-ance: biological mechanisms and clinical significance. *British journal of Haematology*, 2018, 183(2), 185-195. doi: 10.1111/bjh.15565.
- [5] Budde, U., & Schnepfenheim, R. (2010). Von-Willebrand-Erkrankung. In B. Pötzsch, & K. Madlener (Hrsg.) *Hämostaseologie: Grundlagen, Diagnostik, Therapie* (355-363). Berlin Heidelberg: Springer-Verlag.

Abbildungen:

- Hintergrund: Dincic, V. (2020). *VWF: PP-ELISA*. Bern: eigene Abbildung.
- Abbildung 4.1: Dincic, V. (2020). *Vorgehensweise der Arbeit*. Bern: eigene Abbildung.

4. Material, Methodik, Vorgehen

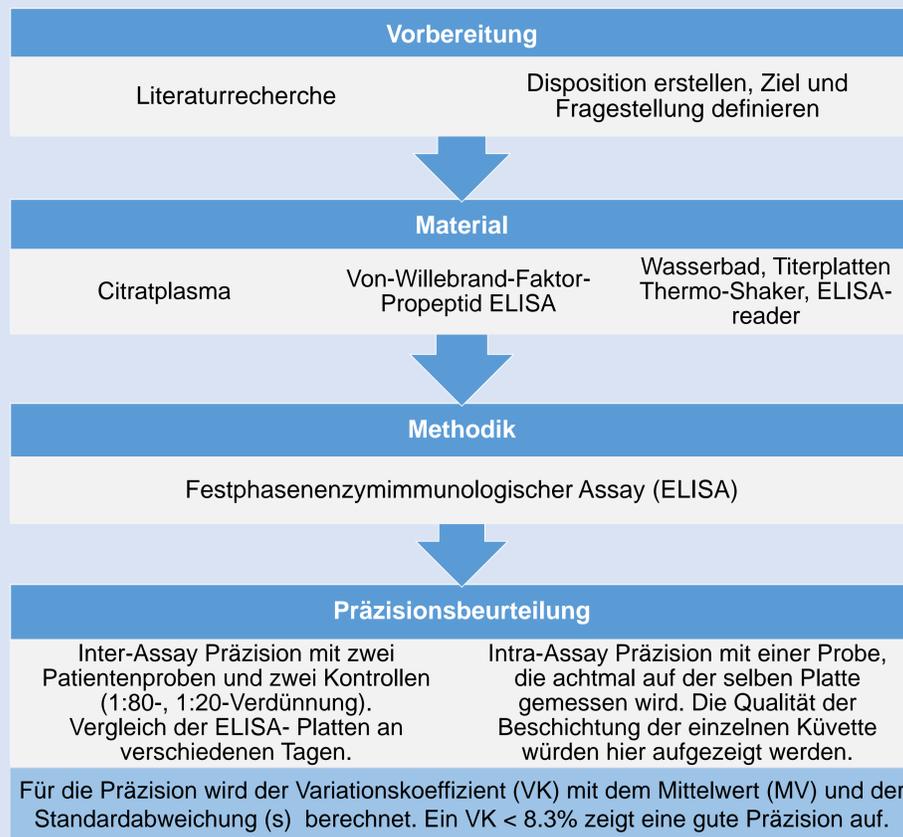


Abbildung 4.1 Vorgehensweise der Arbeit (Dincic, 2020)

5. Ergebnisse/ Resultate

Inter-Assay Präzision

Tabelle 5.1 Inter-Assay Präzision: Mittelwert, Standardabweichung und Variationskoeffizient

Probe	Mittelwert [mIU/ml]	Standardabweichung [mIU/ml]	Variationskoeffizient [%]
119	615.09	236.08	38.38
138	1378.48	435.50	31.59
QC1 1:20	884.88	371.12	41.94
QC2 1:80	1317.00	370.33	28.11

In der Tabelle 5.1 ist die kleinste s bei der Proben-Nr. 119 und die grösste s bei der Proben-Nr. 138. Die Qualitätskontrollen haben ähnliche Werte der s, wobei hierbei der niedrigste VK bei QC2 1:80 (28.11 %) und auch der höchste VK bei QC1 1:20 vorhanden ist (41.94 %). Der VK variiert zwischen 28.11 % und 41.94 %.

Intra-Assay Präzision

Tabelle 5.2 Intra-Assay Präzision: Mittelwert, Standardabweichung und Variationskoeffizient

Probe	Mittelwert [mIU/ml]	Standardabweichung [mIU/ml]	Variationskoeffizient [%]
138	969.38	162.00	16.71

In der Tabelle 5.2 liegt der gemessene MW der Probe 138 bei 969.38 mIU/ml, mit einer s von 162.00 und einem VK von 16.71%.

6. Diskussion

Anhand des Inter-Assays (Tabelle 5.1) und des Intra-Assays (Tabelle 5.2) kann aufgezeigt werden, dass der Test noch nicht präzise genug ist, da alle VK's deutlich über den zu erwarteten Wert (< 8.3%) liegen. Die generierten Resultate dürfen nicht gebraucht werden.

Die Idee, das VWF: PP zu messen, um die VWS-Diagnostik zu erweitern, ist jedoch immernoch ein Gewinn. Mit einer gelungenen Messung könnte theoretisch eine erhöhte VWF-Clearance schneller erkannt werden und so auch eine geeignete Therapie eingeleitet werden. Die Methode, das VWF: PP mit einem ELISA zu messen ist ebenfalls sinnvoll, da es sich um ein Ag handelt.

Als weiterführende Untersuchungen wäre es möglich, die Küvetten des Tests selber zu coaten, um so eine bessere Regelmässigkeit zu erreichen.